

EAST Search History

Ref #	Hits	Search Query	DBs	Default Operator	Plurals	Time Stamp
L1	153	mitchinson.inv.	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2007/12/20 09:24
L2	30	L1 and glucose and cellulase	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2007/12/20 09:29
L3	21	L1 and glucose and (whole cellulase or beta-glucosidase)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 09:35
L4	2	(concentrated glucose) and (whole cellulase or beta-glucosidase)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 09:35
L5	0	(concentrate glucose) and (whole cellulase or beta-glucosidase)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 09:35
L6	2	(concentrate\$ glucose) and (whole cellulase or beta-glucosidase)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 09:36
L7	3	(concentrate\$ near glucose) and (whole cellulase or beta-glucosidase)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 10:00
L8	187	concentrated glucose	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 10:00
L9	301	concentrated near glucose	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 10:00

EAST Search History

L10	907	I and (sophorose or gentiobiose)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 10:01
L11	20	LI and (sophorose or gentiobiose)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 10:02
L12	1	L9 and (sophorose or gentiobiose)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 10:03
L13	11	production near (sophorose or gentiobiose)	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	ADJ	ON	2007/12/20 10:03
S1	123	mitchinson.inv.	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2007/12/20 09:24
S2	0	wo200212464	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2005/03/24 11:11
S3	4059	cellulase.ab.	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2005/03/24 11:11
S4	317	S3 and trichoderma.ab.	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2005/03/24 11:12
S5	13	S4 and recombinant.ab.	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2005/03/24 15:25
S6	2	"6608187".pn.	US-PGPUB; USPAT; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	ON	2005/03/24 15:26

[JP,05-211883,A(1993)]

Japanese (PDF)

File Wrapper Information

[Translation done.]

FULL CONTENTS CLAIM + DETAILED DESCRIPTION TECHNICAL
FIELD PRIOR ART EFFECT OF THE INVENTION TECHNICAL
PROBLEM MEANS EXAMPLE

[Translation done.]

Disclaimer:

This English translation is produced by machine translation and may contain errors. The JPO, the INPIT, and those who drafted this document in the original language are not responsible for the result of the translation.

Notes:

1. Untranslatable words are replaced with asterisks (****).
2. Texts in the figures are not translated and shown as it is.

Translated: 00:23:01 JST 12/21/2007

Dictionary: Last updated 12/14/2007 / Priority: 1. Biotechnology / 2. Natural sciences / 3. Medical/ Pharmaceutical sciences

FULL CONTENTS**[Claim(s)]**

[Claim 1] (a) *Aspergillus* (*Aspergillus*) Sophorose is separated from the oligosaccharide generated using the anion exchanger which carried out equilibration to the process and (b) boric acid type which make the beta-glucosidase which the microbe belonging to ** produces act on glucose, and make oligosaccharide generate. The manufacture method of the sophorose characterized by consisting of a process to refine.

[Claim 2] *Aspergillus* (*Aspergillus*) The microbe belonging to ** is *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*) Mt (114) (FERM P-8681). It comes out and is the manufacture method of a certain sophorose according to claim 1.

[Claim 3] The manufacture method of sophorose according to claim 1 that an anion exchanger is the 4th class methylammonium type anion exchanger.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the method of using a condensation operation of enzyme by using detailed inexpensive glucose as materials about the manufacture method of sophorose, and manufacturing sophorose. The manufactured sophorose is industrially used as an activation agent of cellulase production, and it deals in it.

[0002]

[Description of the Prior Art] Sophorose is cellulase induction potency to the microbe of *Trichoderma*. having is known -- [-- M. -- it is expected Mandels, et al., *J.Bacteriol.*, 83, 400-408,] (1962), and that the cellulase quantity of production will be extended by leaps and bounds if sophorose is manufactured inexpensive.

[0003] The sophorose of existing in a nature as disaccharide of the state of isolation, although first found out as a sugar component of the glycoside of the pigment of the sheath of the Japanese pagoda tree which is leguminous plants is rare, and existing in the acidolysis thing of a starch and royal jelly slightly is known. Therefore, it was completely difficult to obtain sophorose by refining from a natural community.

[0004] Moreover, about manufacture of the sophorose using enzyme, It is *Penicillium MERINI* (*Penicillium melinii*) to beta-1 and 2-glucan which are polysaccharide. Method [E. on which beta-1 to produce and 2-glucanase are made to act T.Reese, et al., and *Can.J.Microbiol.*, 7 309(1961)] And an almond and *Penicillium FANIKYUROZUMU* (*Penicillium funiculosum*) [with the beta-glucosidase to produce] Method [H. prepared from simple sugar Fujimoto, et al., *Agric.Biol.Chem.*, and 52(6)1345-1351(1988)] It is.

[0005] There is a fault referred to as that beta-1 and 2-glucan used as materials are expensive, and moreover generate various oligosaccharide besides sophorose about the former, and it is also about the latter, There was a fault that the yield of target sophorose was low and separation of the gentiobiose which is the structural isomer generated simultaneously, a cellobiose, and lamination nari BIOSU could not be performed.

[0006] Although filter electrophoresis [chemistry and [of sugar] bottom, edited by Japanese Biochemical Society, Tokyo chemistry said ON, and p356 (1976)] and liquid chromatography are known as how to separate sophorose from such a structural isomer mixture conventionally, It was anxious for the establishment of a new purification method which neither of the cases is suitable for extensive manufacture, and can carry them out industrially.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is to offer the method of canceling the above-mentioned technical problem and obtaining sophorose from inexpensive glucose.

[0008]

[Means for Solving the Problem] [this invention] (a) *Aspergillus* (*Aspergillus*) Sophorose is separated from the oligosaccharide generated using the anion exchanger which carried out equilibration to the process and (b) boric acid type which make the beta-glucosidase which the microbe belonging to ** produces act on glucose, and make oligosaccharide generate. It is related with the manufacture method of the sophorose characterized by consisting of a process to refine.

[0009] The (a) process of this invention is a condensation reaction using the enzyme which has the characteristic which the amount of generation of sophorose is increased and lessens the amount of generation of other oligosaccharide which is by-products. As enzyme suitable for this purpose, it is *Aspergillus* (*Aspergillus*). There is beta-glucosidase which the microbe belonging to ** produces. The beta-glucosidase which *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*)M(t)114 (FERM P-8681) specifically produces can be mentioned. If this enzyme is made to act on glucose, the content of the sophorose in the oligosaccharide to generate is usually 3 to 10 weight %, and contains [gentiobiose] 2 to 5 weight % in others for lamination nari BIOSU

two to 15weight %.

[0010] Therefore, it differs from the case where *Penicillium* and the enzyme of almond origin are used when this enzyme was used. A condensation reaction thing with very as few cellobiose contents in by-products as [0.1 to 0.5 weight %] is obtained, and it has many [the amount of generation of sophorose is remarkable and / and] characteristics very advantageous to manufacture of sophorose.

[0011] Next, the (b) process of this invention is a process which separates and refines sophorose, and has the special feature to use the difference of the complex formation ability of boric acid and a saccharide. Although separation of the saccharide using complex formation ability with boric acid is applied to the filter electrophoresis and the high speed liquid chromatography which used boric acid buffer solution, there are very few examples used for the extensive manufacture using column chromatography etc.

[0012] The result in which this invention persons examined wholeheartedly how to separate sophorose from the mixture of the disaccharide structural isomer (sophorose, gentiobiose, lamination nari BIOSU) obtained at the above-mentioned (a) process efficiently, The complex formation ability of sophorose and boric acid established the new extensive method of preparation of the sophorose which finds out a specifically small thing and shows it below compared with gentiobiose or lamination nari BIOSU. Namely, when load of the sugar mixture obtained at the above-mentioned (a) process is carried out to the anion exchanger which carried out equilibration to the boric acid type, [the strong gentiobiose of boric acid and complex formation ability, and lamination nari BIOSU] As a result of eluting the small sophorose of complex formation ability to a column being adsorbed, it became not possible without concentration and carrying out recrystallization about the eluate to refine sophorose in large quantities and efficiently.

[0013] Below, a process is explained for this invention in detail later on. As glucose used as materials, about ten to 90-Bx glucose solution is used, and to glucose, 1 to 20%, the beta-glucosidase originating in the microbe which belongs to this at said *Aspergillus* is added so that it may become 5 to 10% preferably. Although 30-70 degrees C of reaction temperature is 50-65 degrees C preferably and reaction time can be set up arbitrarily, in order to stop the amount of generation of gentiobiose, 6 to 48 hours is suitable.

[0014] In order to remove unreacted glucose after the end of a reaction, and out of a reaction mixture, the general methods (for example, activated carbon column chromatography, a gel chromatography, a membrane process, microorganism treatment, etc.) of simple sugar removal are applied, but activated carbon column chromatography is applied preferably. Load of the enzyme reaction mixture is carried out to an activated carbon column, and glucose is eluted with water. The disaccharide mixture to which it is sticking by ethanol 5% is eluted after an appropriate time. Although the obtained disaccharide fraction consists of mixtures, such as sophorose, gentiobiose, and lamination nari BIOSU, it separates and refines sophorose from the oligosaccharide which generated this mixture using the anion exchanger which carried out equilibration to the boric acid type. In this case, as an anion exchanger to be used, the 4th class methylammonium type anion exchanger is suitable, for example.

[0015] As an example of such the 4th class methylammonium type anion exchanger, a QMA anion exchanger (WOTAZU, brand name accelerator plus QMA) etc. is used. A column is not adsorbed, but the sophorose without boric

acid and complex generation ability is eluted, and gentiobiose and lamination nari BIOSU stick to this column. In addition, subsequently refining of the eluted sophorose fraction adds methanol, performs vacuum concentration until it becomes pH 3.0 or less about cation exchange resin at this fraction, for example, it carries out volatilization transpiration of B4O7- which remained slightly into solution, and is removed. The cation exchange resin used at this time is what is usually used H+ If equilibration is carried out to type, it can be used arbitrarily. Thus, after dissolving the high purity sophorose obtained in heat methanol 90%, the needle crystal of sophorose can be obtained by performing natural air cooling.

[0016]

[Example] Although a work example explains this invention below, this invention is not limited to these.

The beta-glucosidase [*Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*)Mt (114) (FERM P-8681) origin] which is equivalent to 10% of enzyme concentration to the glucose solution of work-example 1 glucose concentration Bx60 was added, and the reaction was performed at 55 degrees C for 18 hours. Glucose unreacted [100g of reaction products] in a 500ml activated carbon column at through and 2500ml of distilled water was made eluted. Next, the disaccharide fraction which stuck to the column was eluted with 2500ml of ethanol solution 5%. The disaccharide fraction was 18.7g.

[0017] Boric acid-ization of the anion exchanger QMA (WOTAZU, brand name accelerator plus QMA) used for refining of sophorose was performed as follows. First, the chloride of a decinormal was added to resin and it agitated for 30 minutes in the pH 3.0 state. Subsequently, after filtering and collecting resin, sodium hydroxide solution of a decinormal was added and it agitated further for 30 minutes in the pH 10.0 state. Excess quantity of 50mM after filtering again and collecting resin Sodium tetraborate solution washed resin. This was filtered and boric-acid-ized QMA(s) were collected.

[0018] After adding 50ml of distilled water to a disaccharide fraction, 600ml of QMA(s) which carried out equilibration to the boric acid type were added, and were agitated for 10 minutes. Subsequently, it filtered and the filtrate containing sophorose was collected. Cation exchange resin (brand name Amberlite 200C (H + type), Rome and hearth company make) is added to this filtrate, and it is Na+ until it becomes pH 3.0 or less. It removed. It is B4O7 although the filtrate which filters and contains a sophorose fraction was collected. - Concentration hardening by drying was carried out adding methanol, in order to remove. The obtained sophorose fraction was 4.9g. Subsequently, after adding methanol 90% and carrying out the heating dissolution, room temperature neglect was carried out and 2.3g of needle crystals of sophorose were obtained.

[0019] The beta-glucosidase [*Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*)Mt (114) (FERMP-8681) origin] which is equivalent to 3% of enzyme concentration to the glucose solution of work-example 2 glucose concentration Bx80 was added, and the reaction was performed at 70 degrees C for 20 hours. Load of 100g of the reaction products was carried out to the activated carbon column (phi5.0x25.0cm, 500cm³). Unreacted glucose was made eluted with 2500ml of distilled water. Next, the disaccharide fraction which stuck to the column was eluted with 2500ml of ethanol solution 5%. The disaccharide fraction was 15.4g.

[0020] After adding 50ml of distilled water to a disaccharide fraction, load was carried out to the column (phi5.0x30.0cm, 590cm³) filled up with the anion exchanger QMA (WOTAZU, brand name accelerator plus QMA) which carried

out equilibration to the boric acid type like the work example 1. 1000ml of distilled water was poured and sophorose fractions were collected. subsequently, recovery liquid -- cation-exchange-resin [brand name [] -- adding Amberlite 200C (H+ type) and] by a Rome and hearth company until it becomes pH 3.0 or less -- Na+ It removed. It is B4O7 although the filtrate which filters and contains a sophorose fraction was collected. - Concentration hardening by drying was carried out adding methanol, in order to remove. The sophorose fraction was 4.1g. Next, after adding methanol to this fraction 90% and carrying out the heating dissolution, room temperature neglect was carried out and 2.0g of needle crystals of sophorose were obtained.

[0021] The sophorose obtained by this invention was added to the strain of *Trichoderma* which is an example of reference 1 cellulase production strain with prescribed concentration. On the other hand, glucose of prescribed concentration was added instead of sophorose as contrast, or the sugar additive-free thing was prepared, the shake culture was performed at 30 degrees C for 18 hours, respectively, and cellulase induction potency was measured. As a result, as shown in Table 1, a sophorose additive area and cellulase activity increase especially remarkable at 10-3M additive area were accepted.

[0022]

[Table 1]

糖質	濃度	セルラーゼ活性 (U/ml)
ソホロース	10^{-2} M	0.01以下
	10^{-3} M	0.43
	10^{-4} M	0.31
グルコース	10^{-2} M	0.03
	10^{-3} M	0.01
	10^{-4} M	0.01
無添加		0.01以下

[0023]

[Effect of the Invention] It became possible to obtain sophorose by using inexpensive glucose as materials by this invention. Therefore, this invention contributes to manufacturing sophorose industrially from glucose. Moreover, production of an efficient cellulase is expected by using the sophorose manufactured by doing in this way.

[Translation done.]

Report Mistranslation

Japanese (whole document in PDF)

PAT-NO: JP405211883A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 05211883 A
TITLE: PRODUCTION OF SOPHOROSE

PUBN-DATE: August 24, 1993

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KAMO, YOSHIHIRO	
SHIMIZU, HIROKO	
HIRAYAMA, MASAO	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
MEIJI SEIKA KAISHA LTD	N/A

APPL-NO: JP04040543
APPL-DATE: January 31, 1992

INT-CL (IPC): C12P019/14 , B01D015/04

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide an industrial method for producing sophorose by using inexpensive glucose as a raw material and utilizing the condensing action of an enzyme.

CONSTITUTION: The objective method for producing sophorose is characterized by comprising a step for reacting a β -glucosidase produced by a microorganism belonging to the genus *Aspergillus* with glucose and producing an oligosaccharide and a step for separating and purifying the sophorose from the produced oligosaccharide using an anion exchange resin equilibrated to a boric acid type.

COPYRIGHT: (C)1993, JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-211883

(43)公開日 平成5年(1993)8月24日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/14	Z	7432-4B		
B 0 1 D 15/04		8014-4D		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 4 頁)

(21)出願番号	特願平4-40543	(71)出願人	000006091 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号
(22)出願日	平成4年(1992)1月31日	(72)発明者	加茂 善弘 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓 株式会社生物科学研究所内
		(72)発明者	清水 裕子 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓 株式会社生物科学研究所内
		(72)発明者	平山 匡男 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓 株式会社生物科学研究所内
		(74)代理人	弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 ソホロースの製造方法

(57)【要約】

【構成】 (a) アスペルギルス(Aspergillus) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼをグルコースに作用させてオリゴ糖を生成させる工程および(b) ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する工程からなることを特徴とするソホロースの製造方法。

【効果】 本発明により安価なグルコースを原料としてソホロースを得ることが可能となった。したがって、本発明はグルコースから工業的にソホロースを製造することに寄与するものである。また、このようにして製造されるソホロースを用いることにより効率的なセルラーゼの生産が期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼをグルコースに作用させてオリゴ糖を生成させる工程および

(b) ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する工程からなることを特徴とするソホロースの製造方法。

【請求項2】 アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物がアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) Mt(114) (FERM P-8681) である請求項1記載のソホロースの製造方法。

【請求項3】 陰イオン交換樹脂が4級メチルアンモニウム型陰イオン交換樹脂である請求項1記載のソホロースの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ソホロースの製造方法に関し、詳しくは安価なグルコースを原料として酵素の縮合作用を利用しソホロースを製造する方法に関する。製造されたソホロースは、セルラーゼ生産の賦活剤として産業的に利用されうる。

【0002】

【従来の技術】ソホロースは、トリコデルマ属の微生物に対しセルラーゼ誘導能を有することが知られており [M. Mandels, et al., J. Bacteriol., 83, 400-408, (1962)], 安価にソホロースが製造されればセルラーゼ生産量が飛躍的に伸びることが期待される。

【0003】ソホロースは、豆科植物であるエンジュの鞘の色素の配糖体の糖成分として最初に見出されたが、自然界に遊離の状態の2糖として存在することは稀で、僅かにゲンブンの酸加水分解物中やロイヤルゼリー中に存在することが知られているにすぎない。従って、天然界からの精製によりソホロースを得ることは全く困難であった。

【0004】また、酵素を用いたソホロースの調製に関しては、多糖体である β -1, 2-グルカンに対しペニシリウム・メリニー(*Penicillium melinii*) の生産する β -1, 2-グルカナナーゼを作用させる方法 [E. T. Reese, et al., Can. J. Microbiol., 7, 309 (1961)] およびアーモンドやペニシリウム・ファニキュロズム (*Penicillium funiculosum*) の生産する β -グルコシダーゼにより単糖から調製する方法 [H. Fujimoto, et al., Agric. Biol. Chem., 52(6), 1345-1351 (1988)] がある。

【0005】前者については、原料となる β -1, 2-グルカンが高価で、しかもソホロースの他に様々なオリゴ糖を生成すると言う欠点があり、後者についても、目的とするソホロースの収率が低く、同時に生成する構造異性体であるゲンチオビオース、セロビオース、ラミナリビオースの分離が行えないという欠点があった。

【0006】従来、このような構造異性体混合物からソ

ホロースを分離する方法としては、沪紙電気泳動〔糖質の化学・下、日本生化学会編、東京化学同人、p356(1976)〕および液体クロマトグラフィーが知られているが、いずれの場合も大量調製には適しておらず、工業的に実施し得る新しい精製法の確立が切望されていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記課題を解消して安価なグルコースよりソホロースを得る方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、(a) アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼをグルコースに作用させてオリゴ糖を生成させる工程および(b) ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する工程からなることを特徴とするソホロースの製造方法に関する。

【0009】本発明の(a)工程は、ソホロースの生成量を増大させ、副産物である他のオリゴ糖の生成量を少なくする特性を有する酵素を用いる縮合反応である。かかる目的に適する酵素としては、アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼがあり、具体的にはアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) M(t)114(FERM P-8681)の生産する β -グルコシダーゼを挙げることができる。この酵素をグルコースに作用させると、生成するオリゴ糖中のソホロースの含有量は通常3~10重量%であり、他にゲンチオビオースを2~15重量%、ラミナリビオースを2~5重量%を含んでいる。

【0010】従って、この酵素を用いるとペニシリウムやアーモンド由来の酵素を使用した場合と異なり、ソホロースの生成量が著しく多く、また副産物中のセロビオース含量が0.1~0.5重量%と非常に少ない縮合反応物が得られ、ソホロースの製造には非常に有利な特性を有している。

【0011】次に、本発明の(b)工程は、ソホロースを分離、精製する工程であり、ホウ酸と糖類との錯体形成能の差を利用することに特色を有している。ホウ酸との錯体形成能を利用した糖類の分離はホウ酸緩衝液を用いた沪紙電気泳動や高速液体クロマトグラフィーに應用されているが、カラムクロマトグラフィー等を用いる大量調製に利用されている例は極めて少ない。

【0012】本発明者らは、上記(a)工程で得られる2糖構造異性体(ソホロース、ゲンチオビオース、ラミナリビオース)の混合物よりソホロースを効率的に分離する方法を鋭意検討した結果、ソホロースとホウ酸との錯体形成能がゲンチオビオースやラミナリビオースに比べて特異的に小さいことを見出し、以下に示すソホロースの新しい大量調製法を確立した。すなわち、ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂に上記(a)工程で得ら

れる糖混合物を負荷させると、ホウ酸と錯体形成能の強いゲンチオビオース、ラミナリビオースは、カラムに吸着されるのに対し、錯体形成能の小さいソホロースは溶出される結果、溶出液を濃縮、再結晶することによりソホロースを大量にかつ効率的に精製することが初めて可能となったのである。

【0013】以下に、本発明を工程を追って詳細に説明する。原料として用いるグルコースとしては、Bx10～90程度のグルコース溶液が使用され、これに前記アスペルギルス属に属する微生物に由来するβ-グルコシダーゼをグルコースに対し1～20%、好ましくは5～10%になるように加える。反応温度は30～70℃、好ましくは50～65℃であり、反応時間は任意に設定可能であるが、ゲンチオビオースの生成量を抑えるためには6～48時間が好適である。

【0014】反応終了後、反応混合物中から未反応のグルコースを除くためには、単糖除去の一般的方法（例えば活性炭カラムクロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、膜処理、微生物処理等）が適用されるが、好ましくは活性炭カラムクロマトグラフィーが適用される。活性炭カラムに酵素反応混合物を負荷し、水でグルコースを溶出する。しかる後、5%エタノールで吸着している2糖混合物を溶出する。得られた2糖画分はソホロース、ゲンチオビオース、ラミナリビオースなどの混合物からなるが、同混合物をホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する。この場合に用いる陰イオン交換樹脂としては、例えば4級メチルアンモニウム型陰イオン交換樹脂が好適である。

【0015】このような4級メチルアンモニウム型陰イオン交換樹脂の具体例としてはQMA陰イオン交換樹脂（ウォーターズ社、商品名アクセルプラスQMA）等が用いられる。ホウ酸と錯体生成能のないソホロースはカラムに吸着されず溶出し、ゲンチオビオースやラミナリビオースは、同カラムに吸着する。溶出されたソホロース画分の精製は、例えばこの画分に陽イオン交換樹脂をpH3.0以下になるまで加え、次いでメタノールを加えて減圧濃縮を行い、溶液中に僅かに残った $B_4O_7^{2-}$ を揮発蒸散させて除く。このとき用いる陽イオン交換樹脂は、通常用いられるものを H^+ 型に平衡化したものであれば任意に使用できる。このようにして得られる高純度ソホロースを90%熱メタノールに溶解させた後、自然冷却を行うことによりソホロースの針状結晶を得ることができる。

【0016】

【実施例】以下に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

グルコース濃度Bx60のグルコース溶液に対して酵素濃度10%に相当するβ-グルコシダーゼ〔アスペルギ

ルス・ニガー(Aspergillus niger)Mt(114)(FERM P-8681)由来〕を加え、55℃で18時間反応を行った。反応生成物100gを500mlの活性炭カラムに通し、2500mlの蒸留水で未反応のグルコースを溶出させた。次に、カラムに吸着した2糖画分を5%エタノール溶液2500mlで溶出した。2糖画分は18.7gであった。

【0017】ソホロースの精製に用いる陰イオン交換樹脂QMA（ウォーターズ社、商品名アクセルプラスQMA）のホウ酸化は以下のようにして行った。まず、樹脂に0.1規定の塩酸を加え、pH3.0の状態ですら30分間攪拌した。次いで、濾過を行い、樹脂を回収した後、0.1規定の水酸化ナトリウム溶液を加えてpH10.0の状態ですら30分間さらに攪拌した。再び濾過を行い樹脂を回収した後、過剰量の50mM 四ホウ酸ナトリウム溶液で樹脂を洗浄した。これを濾過し、ホウ酸化したQMAを回収した。

【0018】2糖画分に蒸留水50mlを加えた後、ホウ酸型に平衡化したQMAを600ml加え10分間攪拌した。次いで、濾過を行い、ソホロースを含む濾液を回収した。この濾液に陽イオン交換樹脂（商品名 Amberlite 200C(H^+ 型)、ローマンアンドハース社製)をpH3.0以下になるまで加え Na^+ を除去した。濾過を行い、ソホロース画分を含む濾液を回収したが、 $B_4O_7^{2-}$ を除去するためにメタノールを加えながら濃縮乾固した。得られたソホロース画分は4.9gであった。次いで、90%メタノールを加えて加熱溶解させた後、室温放置してソホロースの針状結晶を2.3g得た。

【0019】実施例2

グルコース濃度Bx80のグルコース溶液に対して酵素濃度3%に相当するβ-グルコシダーゼ〔アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)Mt(114)(FERMP-8681)由来〕を加え、70℃で20時間反応を行った。反応生成物100gを活性炭カラム(φ5.0×25.0cm, 500cm³)に負荷した。2500mlの蒸留水で未反応のグルコースを溶出させた。次に、カラムに吸着した2糖画分を5%エタノール溶液2500mlで溶出した。2糖画分は15.4gであった。

【0020】2糖画分に蒸留水50mlを加えた後、実施例1と同様にしてホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂QMA（ウォーターズ社、商品名アクセルプラスQMA）を充填したカラム(φ5.0×30.0cm, 590cm³)に負荷した。1000mlの蒸留水を流しソホロース画分を回収した。次いで、回収液に陽イオン交換樹脂〔商品名 Amberlite 200C(H^+ 型)、ローマンアンドハース社製〕をpH3.0以下になるまで加え Na^+ を除去した。濾過を行い、ソホロース画分を含む濾液を回収したが、 $B_4O_7^{2-}$ を除去するためにメタノールを加えながら濃縮乾固した。ソホロース画分は4.1gであった。次に、この画分に90%メタノールを加えて加熱溶解させ

た後、室温放置してソホロースの針状結晶を2.0 g得た。

【0021】参考例1

セルラーゼ生産菌株であるトリコデルマ属の菌株に本発明で得られたソホロースを所定濃度にて加えた。一方、対照としてソホロースの代わりに所定濃度のグルコースを加え、または糖無添加のものを用意し、それぞれ30*

*℃で18時間振とう培養を行い、セルラーゼ誘導能を測定した。その結果、表1に示すように、ソホロース添加区、特に 10^{-3} M添加区で著しいセルラーゼ活性の増大が認められた。

【0022】

【表1】

糖質	濃度	セルラーゼ活性 (U/ml)
ソホロース	10^{-2} M	0.01以下
	10^{-3} M	0.43
	10^{-4} M	0.31
グルコース	10^{-2} M	0.03
	10^{-3} M	0.01
	10^{-4} M	0.01
無添加		0.01以下

【0023】

【発明の効果】本発明により安価なグルコースを原料としてソホロースを得ることが可能となった。したがって、本発明はグルコースから工業的にソホロースを製造※

※することに寄与するものである。また、このようにして製造されるソホロースを用いることにより効率的なセルラーゼの生産が期待される。

[JP,05-211883,A(1993)]

Japanese (PDF)

File Wrapper Information

FULL CONTENTS CLAIM + DETAILED DESCRIPTION TECHNICAL
FIELD PRIOR ART EFFECT OF THE INVENTION TECHNICAL
PROBLEM MEANS EXAMPLE

[Translation done.]

Disclaimer:

This English translation is produced by machine translation and may contain errors. The JPO, the INPIT, and those who drafted this document in the original language are not responsible for the result of the translation.

Notes:

1. Untranslatable words are replaced with asterisks (****).
2. Texts in the figures are not translated and shown as it is.

Translated: 00:23:01 JST 12/21/2007

Dictionary: Last updated 12/14/2007 / Priority: 1. Biotechnology / 2. Natural sciences / 3. Medical/ Pharmaceutical sciences

FULL CONTENTS**[Claim(s)]**

[Claim 1] (a) *Aspergillus* (*Aspergillus*) Sophorose is separated from the oligosaccharide generated using the anion exchanger which carried out equilibration to the process and (b) boric acid type which make the beta-glucosidase which the microbe belonging to ** produces act on glucose, and make oligosaccharide generate. The manufacture method of the sophorose characterized by consisting of a process to refine.

[Claim 2] *Aspergillus* (*Aspergillus*) The microbe belonging to ** is *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*) Mt (114) (FERM P-8681). It comes out and is the manufacture method of a certain sophorose according to claim 1.

[Claim 3] The manufacture method of sophorose according to claim 1 that an anion exchanger is the 4th class methylammonium type anion exchanger.

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Industrial Application] This invention relates to the method of using a condensation operation of enzyme by using detailed inexpensive glucose as materials about the manufacture method of sophorose, and manufacturing sophorose. The manufactured sophorose is industrially used as an activation agent of cellulase production, and it deals in it.

[0002]

[Translation done.]

[Description of the Prior Art] Sophorose is cellulase induction potency to the microbe of *Trichoderma*. having is known -- [-- M. -- it is expected Mandels, et al., *J.Bacteriol.*, 83, 400-408,] (1962), and that the cellulase quantity of production will be extended by leaps and bounds if sophorose is manufactured inexpensive.

[0003] The sophorose of existing in a nature as disaccharide of the state of isolation, although first found out as a sugar component of the glycoside of the pigment of the sheath of the Japanese pagoda tree which is leguminous plants is rare, and existing in the acidolysis thing of a starch and royal jelly slightly is known. Therefore, it was completely difficult to obtain sophorose by refining from a natural community.

[0004] Moreover, about manufacture of the sophorose using enzyme, It is *Penicillium MERINI* (*Penicillium melinii*) to beta-1 and 2-glucan which are polysaccharide. Method [E. on which beta-1 to produce and 2-glucanase are made to act T.Reese, et al., and *Can.J.Microbiol.*, 7 309(1961)] And an almond and *Penicillium FANIKYUROZUMU* (*Penicillium funiculosum*) [with the beta-glucosidase to produce] Method [H. prepared from simple sugar Fujimoto, et al., *Agric.Biol.Chem.*, and 52(6)1345-1351(1988)] It is.

[0005] There is a fault referred to as that beta-1 and 2-glucan used as materials are expensive, and moreover generate various oligosaccharide besides sophorose about the former, and it is also about the latter, There was a fault that the yield of target sophorose was low and separation of the gentiobiose which is the structural isomer generated simultaneously, a cellobiose, and lamination nari BIOSU could not be performed.

[0006] Although filter electrophoresis [chemistry and [of sugar] bottom, edited by Japanese Biochemical Society, Tokyo chemistry said ON, and p356 (1976)] and liquid chromatography are known as how to separate sophorose from such a structural isomer mixture conventionally, It was anxious for the establishment of a new purification method which neither of the cases is suitable for extensive manufacture, and can carry them out industrially.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is to offer the method of canceling the above-mentioned technical problem and obtaining sophorose from inexpensive glucose.

[0008]

[Means for Solving the Problem] [this invention] (a) *Aspergillus* (*Aspergillus*) Sophorose is separated from the oligosaccharide generated using the anion exchanger which carried out equilibration to the process and (b) boric acid type which make the beta-glucosidase which the microbe belonging to ** produces act on glucose, and make oligosaccharide generate. It is related with the manufacture method of the sophorose characterized by consisting of a process to refine.

[0009] The (a) process of this invention is a condensation reaction using the enzyme which has the characteristic which the amount of generation of sophorose is increased and lessens the amount of generation of other oligosaccharide which is by-products. As enzyme suitable for this purpose, it is *Aspergillus* (*Aspergillus*). There is beta-glucosidase which the microbe belonging to ** produces. The beta-glucosidase which *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*)M(t)114 (FERM P-8681) specifically produces can be mentioned. If this enzyme is made to act on glucose, the content of the sophorose in the oligosaccharide to generate is usually 3 to 10 weight %, and contains [gentiobiose] 2 to 5 weight % in others for lamination nari BIOSU

two to 15weight %.

[0010] Therefore, it differs from the case where *Penicillium* and the enzyme of almond origin are used when this enzyme was used. A condensation reaction thing with very as few cellobiose contents in by-products as [0.1 to 0.5 weight %] is obtained, and it has many [the amount of generation of sophorose is remarkable and / and] characteristics very advantageous to manufacture of sophorose.

[0011] Next, the (b) process of this invention is a process which separates and refines sophorose, and has the special feature to use the difference of the complex formation ability of boric acid and a saccharide. Although separation of the saccharide using complex formation ability with boric acid is applied to the filter electrophoresis and the high speed liquid chromatography which used boric acid buffer solution, there are very few examples used for the extensive manufacture using column chromatography etc.

[0012] The result in which this invention persons examined wholeheartedly how to separate sophorose from the mixture of the disaccharide structural isomer (sophorose, gentiobiose, lamination nari BIOSU) obtained at the above-mentioned (a) process efficiently, The complex formation ability of sophorose and boric acid established the new extensive method of preparation of the sophorose which finds out a specifically small thing and shows it below compared with gentiobiose or lamination nari BIOSU. Namely, when load of the sugar mixture obtained at the above-mentioned (a) process is carried out to the anion exchanger which carried out equilibration to the boric acid type, [the strong gentiobiose of boric acid and complex formation ability, and lamination nari BIOSU] As a result of eluting the small sophorose of complex formation ability to a column being adsorbed, it became not possible without concentration and carrying out recrystallization about the eluate to refine sophorose in large quantities and efficiently.

[0013] Below, a process is explained for this invention in detail later on. As glucose used as materials, about ten to 90-Bx glucose solution is used, and to glucose, 1 to 20%, the beta-glucosidase originating in the microbe which belongs to this at said *Aspergillus* is added so that it may become 5 to 10% preferably. Although 30-70 degrees C of reaction temperature is 50-65 degrees C preferably and reaction time can be set up arbitrarily, in order to stop the amount of generation of gentiobiose, 6 to 48 hours is suitable.

[0014] In order to remove unreacted glucose after the end of a reaction, and out of a reaction mixture, the general methods (for example, activated carbon column chromatography, a gel chromatography, a membrane process, microorganism treatment, etc.) of simple sugar removal are applied, but activated carbon column chromatography is applied preferably. Load of the enzyme reaction mixture is carried out to an activated carbon column, and glucose is eluted with water. The disaccharide mixture to which it is sticking by ethanol 5% is eluted after an appropriate time. Although the obtained disaccharide fraction consists of mixtures, such as sophorose, gentiobiose, and lamination nari BIOSU, it separates and refines sophorose from the oligosaccharide which generated this mixture using the anion exchanger which carried out equilibration to the boric acid type. In this case, as an anion exchanger to be used, the 4th class methylammonium type anion exchanger is suitable, for example.

[0015] As an example of such the 4th class methylammonium type anion exchanger, a QMA anion exchanger (WOTAZU, brand name accelerator plus QMA) etc. is used. A column is not adsorbed, but the sophorose without boric

acid and complex generation ability is eluted, and gentiobiose and lamination nari BIOSU stick to this column. In addition, subsequently refining of the eluted sophorose fraction adds methanol, performs vacuum concentration until it becomes pH 3.0 or less about cation exchange resin at this fraction, for example, it carries out volatilization transpiration of B4O7- which remained slightly into solution, and is removed. The cation exchange resin used at this time is what is usually used H+ If equilibration is carried out to type, it can be used arbitrarily. Thus, after dissolving the high purity sophorose obtained in heat methanol 90%, the needle crystal of sophorose can be obtained by performing natural air cooling.

[0016]

[Example] Although a work example explains this invention below, this invention is not limited to these.

The beta-glucosidase [*Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*)Mt (114) (FERM P-8681) origin] which is equivalent to 10% of enzyme concentration to the glucose solution of work-example 1 glucose concentration Bx60 was added, and the reaction was performed at 55 degrees C for 18 hours. Glucose unreacted [100g of reaction products] in a 500ml activated carbon column at through and 2500ml of distilled water was made eluted. Next, the disaccharide fraction which stuck to the column was eluted with 2500ml of ethanol solution 5%. The disaccharide fraction was 18.7g.

[0017] Boric acid-ization of the anion exchanger QMA (WOTAZU, brand name accelerator plus QMA) used for refining of sophorose was performed as follows. First, the chloride of a decinormal was added to resin and it agitated for 30 minutes in the pH 3.0 state. Subsequently, after filtering and collecting resin, sodium hydroxide solution of a decinormal was added and it agitated further for 30 minutes in the pH 10.0 state. Excess quantity of 50mM after filtering again and collecting resin Sodium tetraborate solution washed resin. This was filtered and boric-acid-ized QMA(s) were collected.

[0018] After adding 50ml of distilled water to a disaccharide fraction, 600ml of QMA(s) which carried out equilibration to the boric acid type were added, and were agitated for 10 minutes. Subsequently, it filtered and the filtrate containing sophorose was collected. Cation exchange resin (brand name Amberlite 200C (H + type), Rome and hearth company make) is added to this filtrate, and it is Na+ until it becomes pH 3.0 or less. It removed. It is B4O7 although the filtrate which filters and contains a sophorose fraction was collected. - Concentration hardening by drying was carried out adding methanol, in order to remove. The obtained sophorose fraction was 4.9g. Subsequently, after adding methanol 90% and carrying out the heating dissolution, room temperature neglect was carried out and 2.3g of needle crystals of sophorose were obtained.

[0019] The beta-glucosidase [*Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*)Mt (114) (FERMP-8681) origin] which is equivalent to 3% of enzyme concentration to the glucose solution of work-example 2 glucose concentration Bx80 was added, and the reaction was performed at 70 degrees C for 20 hours. Load of 100g of the reaction products was carried out to the activated carbon column (phi5.0x25.0cm, 500cm3). Unreacted glucose was made eluted with 2500ml of distilled water. Next, the disaccharide fraction which stuck to the column was eluted with 2500ml of ethanol solution 5%. The disaccharide fraction was 15.4g.

[0020] After adding 50ml of distilled water to a disaccharide fraction, load was carried out to the column (phi5.0x30.0cm, 590cm3) filled up with the anion exchanger QMA (WOTAZU, brand name accelerator plus QMA) which carried

out equilibration to the boric acid type like the work example 1. 1000ml of distilled water was poured and sophorose fractions were collected. subsequently, recovery liquid -- cation-exchange-resin [brand name [] -- adding Amberlite 200C (H+ type) and] by a Rome and hearth company until it becomes pH 3.0 or less -- Na+ It removed. It is B4O7 although the filtrate which filters and contains a sophorose fraction was collected. - Concentration hardening by drying was carried out adding methanol, in order to remove. The sophorose fraction was 4.1g. Next, after adding methanol to this fraction 90% and carrying out the heating dissolution, room temperature neglect was carried out and 2.0g of needle crystals of sophorose were obtained.

[0021] The sophorose obtained by this invention was added to the strain of *Trichoderma* which is an example of reference 1 cellulase production strain with prescribed concentration. On the other hand, glucose of prescribed concentration was added instead of sophorose as contrast, or the sugar additive-free thing was prepared, the shake culture was performed at 30 degrees C for 18 hours, respectively, and cellulase induction potency was measured. As a result, as shown in Table 1, a sophorose additive area and cellulase activity increase especially remarkable at 10-3M additive area were accepted.

[0022]

[Table 1]

糖質	濃度	セルラーゼ活性 (U/ml)
ソホロース	10^{-2} M	0.01以下
	10^{-3} M	0.43
	10^{-4} M	0.31
グルコース	10^{-2} M	0.03
	10^{-3} M	0.01
	10^{-4} M	0.01
無添加		0.01以下

[0023]

[Effect of the Invention] It became possible to obtain sophorose by using inexpensive glucose as materials by this invention. Therefore, this invention contributes to manufacturing sophorose industrially from glucose. Moreover, production of an efficient cellulase is expected by using the sophorose manufactured by doing in this way.

[Translation done.]

Report Mistranslation

Japanese (whole document in PDF)

PAT-NO: JP405211883A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 05211883 A
TITLE: PRODUCTION OF SOPHOROSE

PUBN-DATE: August 24, 1993

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KAMO, YOSHIHIRO	
SHIMIZU, HIROKO	
HIRAYAMA, MASAO	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
MEIJI SEIKA KAISHA LTD N/A	

APPL-NO: JP04040543
APPL-DATE: January 31, 1992

INT-CL (IPC): C12P019/14 , B01D015/04

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide an industrial method for producing sophorose by using inexpensive glucose as a raw material and utilizing the condensing action of an enzyme.

CONSTITUTION: The objective method for producing sophorose is characterized by comprising a step for reacting a β -glucosidase produced by a microorganism belonging to the genus *Aspergillus* with glucose and producing an oligosaccharide and a step for separating and purifying the sophorose from the produced oligosaccharide using an anion exchange resin equilibrated to a boric acid type.

COPYRIGHT: (C)1993, JPO&Japio

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-211883

(43)公開日 平成5年(1993)8月24日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/14	Z	7432-4B		
B 0 1 D 15/04		8014-4D		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 4 頁)

(21)出願番号	特願平4-40543	(71)出願人	000006091 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号
(22)出願日	平成4年(1992)1月31日	(72)発明者	加茂 善弘 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓 株式会社生物科学研究所内
		(72)発明者	清水 裕子 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓 株式会社生物科学研究所内
		(72)発明者	平山 匡男 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓 株式会社生物科学研究所内
		(74)代理人	弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 ソホロースの製造方法

(57)【要約】

【構成】 (a) アスペルギルス(Aspergillus) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼをグルコースに作用させてオリゴ糖を生成させる工程および(b) ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する工程からなることを特徴とするソホロースの製造方法。

【効果】 本発明により安価なグルコースを原料としてソホロースを得ることが可能となった。したがって、本発明はグルコースから工業的にソホロースを製造することに寄与するものである。また、このようにして製造されるソホロースを用いることにより効率的なセルラーゼの生産が期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼをグルコースに作用させてオリゴ糖を生成させる工程および

(b) ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する工程からなることを特徴とするソホロースの製造方法。

【請求項2】 アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物がアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) Mt(114) (FERM P-8681) である請求項1記載のソホロースの製造方法。

【請求項3】 陰イオン交換樹脂が4級メチルアンモニウム型陰イオン交換樹脂である請求項1記載のソホロースの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ソホロースの製造方法に関し、詳しくは安価なグルコースを原料として酵素の縮合作用を利用しソホロースを製造する方法に関する。製造されたソホロースは、セルラーゼ生産の賦活剤として産業的に利用される。

【0002】

【従来の技術】ソホロースは、トリコデルマ属の微生物に対しセルラーゼ誘導能を有することが知られており [M.Mandels, et al., J. Bacteriol., 83, 400-408, (1962)], 安価にソホロースが製造されればセルラーゼ生産量が飛躍的に伸びることが期待される。

【0003】ソホロースは、豆科植物であるエンジュの鞘の色素の配糖体の糖成分として最初に見出されたが、自然界に遊離の状態の2糖として存在することは稀で、僅かにデンプンの酸加水分解物中やロイヤルゼリー中に存在することが知られているにすぎない。従って、天然界からの精製によりソホロースを得ることは全く困難であった。

【0004】また、酵素を用いたソホロースの調製に関しては、多糖体である β -1, 2-グルカンに対しペニシリウム・メリニー(*Penicillium melinii*) の生産する β -1, 2-グルカナナーゼを作用させる方法 [E.T.Reese, et al., Can.J.Microbiol., 7, 309(1961)] およびアーモンドやペニシリウム・ファニキュロズム(*Penicillium funiculosum*) の生産する β -グルコシダーゼにより単糖から調製する方法 [H.Fujimoto, et al., Agric. Biol.Chem., 52(6), 1345-1351(1988)] がある。

【0005】前者については、原料となる β -1, 2-グルカンが高価で、しかもソホロースの他に様々なオリゴ糖を生成すると言う欠点があり、後者についても、目的とするソホロースの収率が低く、同時に生成する構造異性体であるゲンチオビオース、セロビオース、ラミナリビオースの分離が行えないという欠点があった。

【0006】従来、このような構造異性体混合物からソ

ホロースを分離する方法としては、沪紙電気泳動〔糖質の化学・下、日本生化学会編、東京化学同人、p356(1976)〕および液体クロマトグラフィーが知られているが、いずれの場合も大量調製には適しておらず、工業的に実施し得る新しい精製法の確立が切望されていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記課題を解消して安価なグルコースよりソホロースを得る方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、(a) アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼをグルコースに作用させてオリゴ糖を生成させる工程および(b) ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する工程からなることを特徴とするソホロースの製造方法に関する。

【0009】本発明の(a)工程は、ソホロースの生成量を増大させ、副産物である他のオリゴ糖の生成量を少なくする特性を有する酵素を用いる縮合反応である。かかる目的に適する酵素としては、アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属する微生物の生産する β -グルコシダーゼがあり、具体的にはアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) M(t)114(FERM P-8681)の生産する β -グルコシダーゼを挙げることができる。この酵素をグルコースに作用させると、生成するオリゴ糖中のソホロースの含有量は通常3~10重量%であり、他にゲンチオビオースを2~15重量%、ラミナリビオースを2~5重量%を含んでいる。

【0010】従って、この酵素を用いるとペニシリウムやアーモンド由来の酵素を使用した場合と異なり、ソホロースの生成量が著しく多く、また副産物中のセロビオース含量が0.1~0.5重量%と非常に少ない縮合反応物が得られ、ソホロースの製造には非常に有利な特性を有している。

【0011】次に、本発明の(b)工程は、ソホロースを分離、精製する工程であり、ホウ酸と糖類との錯体形成能の差を利用することに特色を有している。ホウ酸との錯体形成能を利用した糖類の分離はホウ酸緩衝液を用いた沪紙電気泳動や高速液体クロマトグラフィーに應用されているが、カラムクロマトグラフィー等を用いる大量調製に利用されている例は極めて少ない。

【0012】本発明者らは、上記(a)工程で得られる2糖構造異性体(ソホロース、ゲンチオビオース、ラミナリビオース)の混合物よりソホロースを効率的に分離する方法を鋭意検討した結果、ソホロースとホウ酸との錯体形成能がゲンチオビオースやラミナリビオースに比べて特異的に小さいことを見出し、以下に示すソホロースの新しい大量調製法を確立した。すなわち、ホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂に上記(a)工程で得ら

れる糖混合物を負荷させると、ホウ酸と錯体形成能の強いゲンチオビオース、ラミナリビオースは、カラムに吸着されるのに対し、錯体形成能の小さいソホロースは溶出される結果、溶出液を濃縮、再結晶することによりソホロースを大量にかつ効率的に精製することが初めて可能となったのである。

【0013】以下に、本発明を工程を追って詳細に説明する。原料として用いるグルコースとしては、Bx10~90程度のグルコース溶液が使用され、これに前記アスペルギルス属に属する微生物に由来するβ-グルコシダーゼをグルコースに対し1~20%、好ましくは5~10%になるように加える。反応温度は30~70℃、好ましくは50~65℃であり、反応時間は任意に設定可能であるが、ゲンチオビオースの生成量を抑えるためには6~48時間が好適である。

【0014】反応終了後、反応混合物中から未反応のグルコースを除くためには、単糖除去の一般的方法（例えば活性炭カラムクロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、膜処理、微生物処理等）が適用されるが、好ましくは活性炭カラムクロマトグラフィーが適用される。活性炭カラムに酵素反応混合物を負荷し、水でグルコースを溶出する。しかる後、5%エタノールで吸着している2糖混合物を溶出する。得られた2糖画分はソホロース、ゲンチオビオース、ラミナリビオースなどの混合物からなるが、同混合物をホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂を用いて生成したオリゴ糖からソホロースを分離、精製する。この場合に用いる陰イオン交換樹脂としては、例えば4級メチルアンモニウム型陰イオン交換樹脂が好適である。

【0015】このような4級メチルアンモニウム型陰イオン交換樹脂の具体例としてはQMA陰イオン交換樹脂（ウォーターズ社、商品名アクセルプラスQMA）等が用いられる。ホウ酸と錯体生成能のないソホロースはカラムに吸着されず溶出し、ゲンチオビオースやラミナリビオースは、同カラムに吸着する。溶出されたソホロース画分の精製は、例えばこの画分に陽イオン交換樹脂をpH3.0以下になるまで加え、次いでメタノールを加えて減圧濃縮を行い、溶液中に僅かに残った $B_4O_7^{2-}$ を揮発蒸散させて除く。このとき用いる陽イオン交換樹脂は、通常用いられるものを H^+ 型に平衡化したものであれば任意に使用できる。このようにして得られる高純度ソホロースを90%熱メタノールに溶解させた後、自然冷却を行うことによりソホロースの針状結晶を得ることができる。

【0016】

【実施例】以下に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

グルコース濃度Bx60のグルコース溶液に対して酵素濃度10%に相当するβ-グルコシダーゼ〔アスペルギ

ルス・ニガー(Aspergillus niger)Mt(114)(FERM P-8681)由来〕を加え、55℃で18時間反応を行った。反応生成物100gを500mlの活性炭カラムに通し、2500mlの蒸留水で未反応のグルコースを溶出させた。次に、カラムに吸着した2糖画分を5%エタノール溶液2500mlで溶出した。2糖画分は18.7gであった。

【0017】ソホロースの精製に用いる陰イオン交換樹脂QMA（ウォーターズ社、商品名アクセルプラスQMA）のホウ酸化は以下のようにして行った。まず、樹脂に0.1規定の塩酸を加え、pH3.0の状態で30分間攪拌した。次いで、 H_2O 過を行い、樹脂を回収した後、0.1規定の水酸化ナトリウム溶液を加えてpH10.0の状態で30分間さらに攪拌した。再び H_2O 過を行い樹脂を回収した後、過剰量の50mM 四ホウ酸ナトリウム溶液で樹脂を洗浄した。これを H_2O 過し、ホウ酸化したQMAを回収した。

【0018】2糖画分に蒸留水50mlを加えた後、ホウ酸型に平衡化したQMAを600ml加え10分間攪拌した。次いで、 H_2O 過を行い、ソホロースを含む H_2O 液を回収した。この H_2O 液に陽イオン交換樹脂（商品名 Amberlite 200C(H^+ 型)、ロームアンドハース社製)をpH3.0以下になるまで加え Na^+ を除去した。 H_2O 過を行い、ソホロース画分を含む H_2O 液を回収したが、 $B_4O_7^{2-}$ を除去するためにメタノールを加えながら濃縮乾固した。得られたソホロース画分は4.9gであった。次いで、90%メタノールを加えて加熱溶解させた後、室温放置してソホロースの針状結晶を2.3g得た。

【0019】実施例2

グルコース濃度Bx80のグルコース溶液に対して酵素濃度3%に相当するβ-グルコシダーゼ〔アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)Mt(114)(FERM P-8681)由来〕を加え、70℃で20時間反応を行った。反応生成物100gを活性炭カラム(φ5.0×25.0cm, 500cm³)に負荷した。2500mlの蒸留水で未反応のグルコースを溶出させた。次に、カラムに吸着した2糖画分を5%エタノール溶液2500mlで溶出した。2糖画分は15.4gであった。

【0020】2糖画分に蒸留水50mlを加えた後、実施例1と同様にしてホウ酸型に平衡化した陰イオン交換樹脂QMA（ウォーターズ社、商品名アクセルプラスQMA）を充填したカラム(φ5.0×30.0cm, 590cm³)に負荷した。1000mlの蒸留水を流しソホロース画分を回収した。次いで、回収液に陽イオン交換樹脂〔商品名 Amberlite 200C(H^+ 型)、ロームアンドハース社製)をpH3.0以下になるまで加え Na^+ を除去した。 H_2O 過を行い、ソホロース画分を含む H_2O 液を回収したが、 $B_4O_7^{2-}$ を除去するためにメタノールを加えながら濃縮乾固した。ソホロース画分は4.1gであった。次に、この画分に90%メタノールを加えて加熱溶解させ

た後、室温放置してソホロースの針状結晶を2.0g得た。

【0021】参考例1

セルラーゼ生産菌株であるトリコデルマ属の菌株に本発明で得られたソホロースを所定濃度にて加えた。一方、対照としてソホロースの代わりに所定濃度のグルコースを加え、または糖無添加のものを用意し、それぞれ30*

*℃で18時間振とう培養を行い、セルラーゼ誘導能を測定した。その結果、表1に示すように、ソホロース添加区、特に 10^{-3} M添加区で著しいセルラーゼ活性の増大が認められた。

【0022】

【表1】

糖質	濃度	セルラーゼ活性 (U/ml)
ソホロース	10^{-2} M	0.01以下
	10^{-3} M	0.43
	10^{-4} M	0.31
グルコース	10^{-2} M	0.03
	10^{-3} M	0.01
	10^{-4} M	0.01
無添加		0.01以下

【0023】

【発明の効果】本発明により安価なグルコースを原料としてソホロースを得ることが可能となった。したがって、本発明はグルコースから工業的にソホロースを製造※

※することに寄与するものである。また、このようにして製造されるソホロースを用いることにより効率的なセルラーゼの生産が期待される。